Anyplex™ II

RB5 Detection

(Cat. No. RB7500Y)

Sistema Anyplex™ II PCR para detection de *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, y *Bordetella parapertussis* a partir de aspirado nasofaringeo, hisopado nasofaringeo, lavado broncoalveolar, y esputo.

Para uso con el:

1. CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad)

TABLE OF CONTENTS

NOTICES ---------- 3

INTENDED USE ---------- 4

PRINCIPLES AND PROCEDURE OVERVIEW ---------- 4

BACKGROUND INFORMATION ---------- 6

REAGENTS ---------- 7

STORAGE AND HANDLING ---------- 8

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED ---------- 8

PROTOCOL ---------- 9

REAL-TIME PCR INSTRUMENT SET UP AND RESULTS ANALYSIS ---------- 16

RESULTS ---------- 26

TROUBLESHOOTING ---------- 30

PERFORMANCE ---------- 32

REFERENCES ---------- 36

EXPLANATION OF SYMBOLS ---------- 37

ORDERING INFORMATION ---------- 38

NOTICIAS

- Este producto se puede utilizar con propósitos de diagnóstico *in vitro* (IVD, *In Vitro Diagnostics*) en UE dado que la marca IVD CE está aprobada por la Directiva UE (98/79/EC).
- Los tipos de muestras aplicables son: **aspirados nasofaríngeos, hisopados nasofaríngeos, lavado bronquio-alveolar y esputo**. Esta prueba no se ha validado para otro tipo de muestras.
- **Almacene las muestras de ADN a -70° C hasta su uso y manténgalas en hielo durante el tiempo que sean utilizadas.**
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir en muestras que son repetidamente congeladas y descongeladas o almacenadas por largos periodos de tiempo.
- La confiabilidad de los resultados depende de la recolección adecuada de la muestra, el transporte, almacenamiento y procesamiento.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debe procesarse en una manera unidireccional.
- Siempre use guantes desechables en cada área y cámbielos antes de ingresar a las diferentes áreas. Cambie los guantes inmediatamente si se contaminan o trátelos con reactivo DNA decontaminante.
- Dedicar suministros y equipo a las áreas de trabajo separadas y no moverlos de un área a otra.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba o fume en las áreas de trabajo del laboratorio. Use guantes desechables libres de polvo, bata de laboratorio y gafas protectoras cuando manipule muestras y reactivos. Lave las manos después de manipular muestras y los reactivos de la prueba.
- Evite contaminar los reactivos al extraer alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda el uso de puntas para pipetas estériles, desechables y con filtro resistente a aerosoles.
- No mezcle los reactivos de diferentes lotes o de tubos diferentes del mismo lote.
- No use este producto después de la fecha de vencimiento.
- Use tubos de tapa rosca y evite las salpicaduras o contaminación cruzada de muestras durante la preparación.
- Se cuidadoso para no contaminar los reactivos con ácidos nucleicos extraidos, productos de la PCR, y control positivo. Para prevenir la contaminación delos reactivos, se recomienda usar puntas con filtro.
- Use áreas separadas para cada experimento.
- Use un set diferente de pipetas para cada área: extracción de ADN, mezcla de reactivos, la adición de ácido nucleico de molde y la adición del producto de PCR.
- Solo en un espacio designado, abra los tubos de reacción o tiras después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Almacene el material positivo aparte de los reactivos del kit.
- Los procedimientos de seguridad en el laboratorio se deben tener en cuenta para manipular las muestras.
- Deben seguirse los procedimientos de seguridad del laboratorio cuando se manipulen las muestras. Limpie y desinfecte a fondo todas la superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0.5% (en agua desionizada o destilada)

INTENCION DE USO

El ensayo Anyplex™ II RB5 Detection es una prueba cuantitativa *in vitro* test para la detección de *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, y *Bordetella parapertussis* en muestras de aspirado nsaofaringeo, hisopado nasofaringeo, lavado bronquio-alveolar y esputo.

PRINCIPIOS Y PROCEDIMIENTO

1. Principios

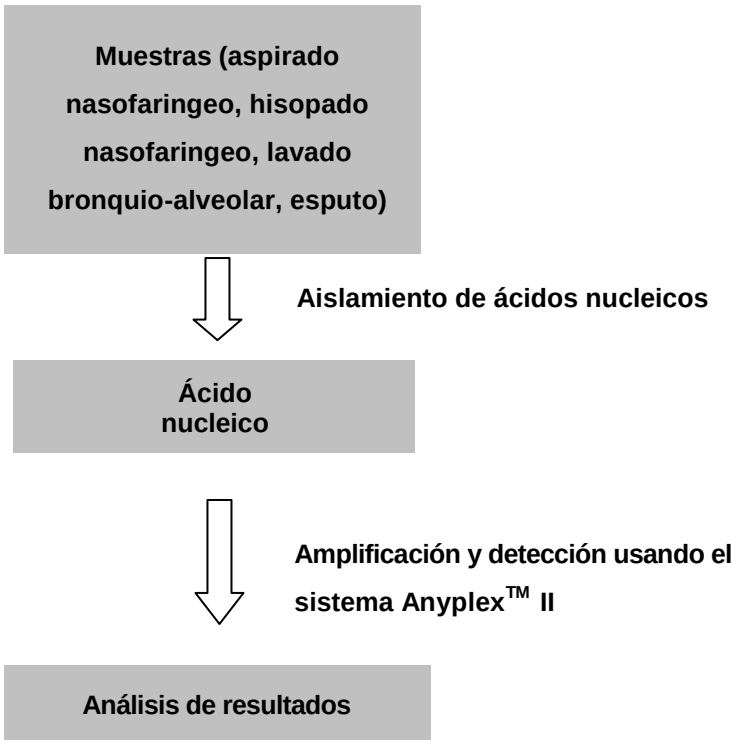
La prueba de detección RV16 de Anyplex™ II es representativa de la tecnología de Seegene y está basada en la nueva tecnología TOCE™, la cual permite detectar múltiples patógenos en un solo canal de fluorescencia en los instrumentos para PCR en tiempo real. En los ensayos de curvas de disociación actuales, se observan con frecuencia diferencias de temperatura entre los ADN que muestran una gran variación en sus secuencias, lo que resulta problemático en el área de diagnóstico clínico, donde es crítica la exactitud y reproducibilidad de las pruebas. No obstante, la tecnología TOCE™ está diseñada para no verse afectada por variaciones en la secuencia, por lo tanto, garantiza valores de Tm consistentes.

El Anyplex™ II RB5 Detection representa una nueva clase de pruebas moleculares por CMTA-cíclico (Atrapador-cíclico análisis de la temperatura de fusión) que es un multiplexado. El método de CMTA-cíclico puede discriminar mayor patógenos en muestras co-infectadas. Es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real que permite la amplificación, detección y diferenciación simultánea del material genético de *Chlamydophila pneumonia* (CP), *Mycoplasma pneumonia* (MP), *Legionella pneumophila* (LP), *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella parapertussis* (BPP) y Control Interno (IC).

En la PCR, la eficiencia puede reducirse por inhibidores que se pueden presentar en las muestras clínicas. Un control interno (IC) es incorporado dentro del producto como un conjunto en el control del proceso para monitorear el aislamiento de ácidos nucleicos y verificar una posible inhibición de la PCR. El IC es co-amplificado con los ácidos nucleicos objetivos en las muestras clínicas.

El sistema Uracil-DNA glicosilasa (UDG) es empleado en el AnyplexTM II RB5 Detection. La función del UDG es prevenir la mutagénesis por eliminación del uracil de las moléculas de DNA por escisión de N-glicosílico unido e iniciar la base de reparación por escisión (BER) Por lo tanto, los sistemas de UDG se utilizan para controlar la contaminación cruzada de las muestras con amplicones.

2. Procedimiento


Muestras (aspirado nasofaringeo, hisopado nasofaringeo, lavado bronquio-alveolar, esputo)
Aislamiento de ácidos nucleicos
Ácido nucleico
Amplificación y detección usando el sistema Anyplex™ II
Análisis de resultados

< Procedimiento general con el kit Anyplex TM II RB5 Detection>

ANTECEDENTES

Las infecciones del tracto respiratorio, principalmente en la forma de neumonia, es una causa importante de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños y ancianos. Las neumonías agudas caracterizadas por repentinos inicios clasificados en dos grupos: neumonía adquirida en la comunidad (CAP) y la neumonía nosocomial. El diagnóstico microbiológico se considera crítico para los tratamientos adecuados de los pacientes, pero la mayoría de los estudios informan, las dificultades del diagnóstico etiológico en el 50% de los casos de la PAC. La neumonía atípica causada por *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, y *Legionella pneumophila*, representa el 15 a 50% de todos los casos de CAP. *Chlamydophila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* fueron los organismos causantes de un tercio de los casos de neumonía en la infancia, con muchos pacientes que tienen infecciones duales.

La *Legionella pneumophila* es el patógeno más común del que se reconocen 42 especies. Las importantes tasas de mortalidad entre los ancianos y los pacientes con enfermedad subyacente grave pueden ocurrir como resultado de la infección con este patógeno. El retraso en el diagnóstico también puede resultar en aumento de la mortalidad.

La *Bordetella pertussis* es el agente causante de la tos ferina (pertusis), neumonía, bronquitis y en los seres humanos. La tos ferina es una enfermedad infecciosa que se produce en todo el mundo con una alta prevalencia entre los niños pequeños no vacunados y recientemente ha resurgido en poblaciones altamente vacunadas. Como los síntomas de la tos ferina también son los causados por las especies relacionadas de bacterias incluyendo *Bordetella parapertussis Bordetella holmesii*, aunque las infecciones por *Bordetella parapertussis* son normalmente menos severas. Por lo tanto, es muy importante el diagnóstico temprano confiable de la tos ferina para comenzar un tratamiento inmediato con antibióticos, ya que requiere distinguir entre *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.

La identificación rápida y exacta de estos agentes causantes es un componente clave para la creación de un pronóstico adecuado, la facilitación del tratamiento temprano, y tal vez, la atenuación de las preocupaciones de salud pública. Las técnicas clásicas para la identificación microbiológica, sin embargo, no pueden proporcionar un medio eficaz de diagnóstico, porque la mayoría de estos organismos crecen ya sea lentamente o en cultivo, lo que lleva a un retraso en la detección y el diagnóstico.

La PCR multiplex en tiempo real ha sido desarrollado para detectar *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* en una prueba sencilla. Estos ensayos proven la medición cualitativa de identificación de patógenos de una manera rápida, sensible, específica y costo-efectiva.

REACTIVOS

Los reactivos de este kit son suficientes para 50 determinaciones.

Solicitar información de AnyplexTM II Detección RB5 (RB7500Y)

Anyplex™ II RB5 Detection			
Simbolo	**Contenido**	**Volumen**	**Descripcion**
Primer	4X RB5 TOM	250 µL	TOCE Oligo Mix (TOM): - Reactivos de amplificación y detección
Premix	4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)	250 µL	- DNA polimerasa - Uracil-DNA glicosilase (UDG) - Buffer que contiene dNTPs
CONTROL +	RB5 PC	25 µL	Control Positivo (PC) - Mezcla de clones patógenos
Water	Agua libre de RNasa	1,000 µL	Calidad Ultrapura, grado PCR
CONTROL IC	RB5 IC	500 µL	Control Interno Exógeno (IC)
	Manual de Usuario		

Anyplex™ II es una marca de Seegene, Inc.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACION

Los componentes del Anyplex TM II RB5 Detection deben ser almacenados a -20°C. Todos los componentes son estables en condiciones de almacenamiento recomendadas hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida, ya que esto puede reducir la sensibilidad.

Si los reactivos van a ser utilizados de forma intermitente, se deben almacenar en alícuotas.

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Guantes desechables libres de talco (látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustables) y puntas estériles
- Microcentrífuga para tubos de 1.5 ml
- Kit para aislamiento de ácidos nucleicos (ver Aislamiento de Ácidos Nucleicos)
- Proteinasa K (para SEEPREP12, No. De Cat. P4850, SIGMA)
- Kit de Transcripción reversa (No. De Cat. SGRT801, Seegene)
- Máquina de hielo
- Centrífuga de mesa
- Agitador *vórtex*
- Equipo para PCR en tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad)
- Tiras de 8 tubos de bajo perfil de 0.2 ml sin tapas (color blanco, No. Cat. TLS0851, Bio-Rad)
- Tiras de 8 tapas planas de grado óptico (No. Cat. TCS0803, Bio-Rad)
- Plato de 96 pozos, pozo blanco. (cat. No. HSP-9655, Bio-Rad)
- Solución salina

PROTOCOLO

1. Recolección de la muestra, almacenamiento y transporte

Nota: Todas las muestras tienen que ser tratadas como materiales potencialmente infecciosos. Sólo las muestras que sean recogidas, transportadas y almacenadas y atiendan estrictamente las siguientes normas e instrucciones, serán permitidas:

Nota: Para garantizar una alta calidad de las muestras, se deben transportarse lo más rápidamente posible. Las muestras tienen que ser transportadas en las condiciones de temperatura indicadas.

A. Recolección de las muestras

Esputo

- Dar instrucciones claras a los pacientes cuando recojan las muestras de esputo. Los pacientes deben tomar muestras ya sea exterior al aire libre o lejos de otras personas. Los pacientes no deben tomar muestras en espacios cerrados tales como inodoros.
- Lavar la boca con agua, pero no cepillarse los dientes antes de recoger el esputo. El paciente debe toser profundamente y expectorar directamente en el recipiente.
- Una muestra de esputo debe tener un volumen de 3 ~ 5 ml.

Aspirado nasofaríngeo, hisopado nasofaríngeo, lavado bronquioalveolar

- El aspirado nasofaríngeo, el hisopado nasofaríngeo, y el lavado bronqueoalveolar son examinadas rutinariamente para patógenos respiratorios comunes.
- Obtener las muestras puede ser difícil en algunos pacientes. En tales casos, el hisopado nasofaríngeo puede recolectarse simple y eficientemente con el hisopo de nylon, El medio universal de transporte (UTM) y el eNat.

Fabricante	Dispositivo de recolección de muestra	Categoria No.
COPAN	ESwab	482CE
COPAN	eNat	606CS01P
COPAN	UTM con hisopos	360C/305C
DIAGNOSTIC HYBRIDS	UTM con hisopo flexible	403/406C

Nota: nosotros recomendamos el uso de UTM o eNat, cuando se aplican en el MICROLAM NIMBUS IVD, MICROLAB STARTlet).

B. Almacenamiento de muestras

La sensibilidad de un ensayo puede disminuir si las muestras son congeladas y descongeladas rutinariamente durante períodos de tiempo prolongados.

- Almacene las muestras a 4° C hasta por 72 horas antes de su procesamiento. Almacene las muestras restantes a < - 70° C.

C. Transporte de muestras

Para asegurar la calidad de las muestras, éstas deben transportarse tan pronto como sea posible. Las muestras deben transportarse en las condiciones de temperatura indicadas.

- Empaque las muestras cuidadosamente para evitar fugas y roturas.
- Las muestras deben ser transportadas en frió.
- Las muestras deben enviarse al laboratorio tan pronto como sea posible después de su recolección, siguiendo las instrucciones de laboratorio para el transporte. Las muestras deben ser transportadas siguiendo también las disposiciones locales y nacionales para el transporte de material patógeno

2. Aislamiento de Ácidos Nucleicos

Diversos fabricantes ofrecen kits para aislamiento de ácidos nucleicos. La cantidad de muestra resultante puede variar dependiendo del protocolo utilizado. Los kits de aislamiento deben ser validados para usar con este kit.

A. Pre-tratamiento de las muestras

Nota: El proceso de pre-tratamiento para extraer los ácidos nucleicos es el mismo de los kits de extracción manual y los sistemas de purificación automática (SEEPREP12™, MICROLAB Nimbus IVD, MICROLAB STARlet).

Nota: Recolecte la muestra como aspirado nasofaríngeo. Diluya la muestra con solución salina si la muestra es muy gruesa

Esputo

- En un tubo cónico de 15 mL, adicione solución salina con la muestra (1:2) y mezcle en el vortex durante un minuto.

- Incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Transfiera el volumen recomendado (Ver Recomendación Vol. de 2-C, D) de solución salina a un nuevo tubo.
- Siga el protocolo del kit de aislamiento.

Nota: En caso de que las muestras no estén viscosas, el paso de tratamiento con solución salina no es requerido.

B. Control Interno

B-1. Confirmación del procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos y la inhibición de la PCR

Nota: El Control Interno del RB5 está incluido en el kit. Esto permite al usuario confirmar no sólo el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos, sino también la posibilidad de inhibición de la PCR.

- 10 µL del RB5 IC debe adicionarse a cada muestra antes de la extracción de ácidos nucleicos.
- El RB5 IC se puede añadir ya sea a la mezcla de solución de muestra y tampón de lisis o al tampón de lisis directamente.

Note: En caso de ser añadido a tampón de lisis directamente, es posible hacer burbujas, se debe tener cuidado.

B-2. Con el fin de confirmar la inhibición de la PCR

El IC RB5 puede opcionalmente ser utilizado exclusivamente para comprobar posibles de inhibición de la PCR no para confirmar el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. Por sólo esta aplicación, añadir 2 µl de la IC RB5 por reacción directa a la PCR Mastermix.

C. Kits de preparación manual

Kit de aislamiento	Fabricante	Cat. No.	Vol. recomendado
QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit*	QIAGEN	57704	Muestra: 190 µL Elucion: 40 µL
Ribo_spin vRD* (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	GeneAll	302-150 SG1701**	Muestra: 290 µL Elucion: 40 µL

* Para ambas muestras de virus y bacterias respiratorios.

** Si usted desea comprar los productos anteriores de Seegene, Inc., por favor utilice este No.Cat.

Nota: El kit Ribo_spin vRD kit solo ha sido validado para los siguientes tipos de muestras: aspirado nasofaringeo, hisopado nasofaringeo, lavado bronquiolveolar.

D. Sistema de Purificación Automatizado

D-1. SEEPREP12™

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Cat. No.	Vol. Recomendado
SEEPREP12™	NorDiag	SPN1200*	
SEEPREP12™ Viral NA Kit	NorDiag	SPN1004*	Muestra: 530 μL Elución: 60 μL

**Si usted desea comprar los productos anteriores de Seegene, Inc., por favor utilice este No Cat.

Nota: El SEEPREP12™ solo ha sido validado para los siguientes tipos de muestras: aspirado nasofaringeo, hisopado nasofaringeo, lavado bronquiolveolar.

- Adicione 10 μL de Proteinasa K (20mg/mL) a cada tubo estéril para muestra de 1.5 mL debidamente etiquetado.
- Transfiera 540 μL de muestra (incluyendo los **10 μL de RB5 IC)** al tubo que contiene los 10 μL de Proteinasa K, mezcle el contenido mediante ligeros golpecillos.
- El cartucho y la punta ensamblada se colocan en el instrumento.
- Coloque el tubo de elución de 1.5 mL en el interior del equipo.
- Presione "**Continue**" en la primera pantalla para permitir que el equipo se inicie.
- Presione "**Start protocol**" en el menú principal del SEEPREP12™.
- En el menú de selección de protocolos, presione " SPN Viral NA V1.1" .
- En el menú de selección de volumen de muestra, presione "**550 μL**" y en la selección del volumen de elución, presione "**60 μL**".
- Siga las instrucciones en pantalla para cargar el instrumento.
- Después de que todos los pasos se han completado, cierre la puerta y comience el ensayo.

D-2. MICROLAB NIMBUS IVD

Nota: Mirar el manual de operación del MICROLAB NIMBUS IVD.

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Vol. recomendado
MICROLAB NIMBUS IVD	Hamilton	
STARMag 96 Virus	Seegene	Muestra: 600 µl Elución: 100 µl

*Si usted desea comprar los productos anteriores de Seegene, Inc., por favor utilice este No Cat.

Nota: El MICROLAB Nimbus IVD solo ha sido validado para los siguientes tipos de muestras: aspirado nasofaringeo, hisopado nasofaringeo, lavado bronquiolveolar.

D-3. MICROLAB STARlet

Nota: Observar el manual de operación del MICROLAB STARlet.

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Cat. No.	Vol. recomendado
MICROLAB STARlet	Hamilton	173000-075*	
STARMag 96 Virus	Seegene	744800.4	Muestra: 600 µl Elución: 100 µl

*Si usted desea comprar los productos anteriores de Seegene, Inc., por favor utilice este No Cat.

Nota: El MICROLAB STARlet solo ha sido validado para los siguientes tipos de muestras: aspirado nasofaringeo, hisopado nasofaringeo, lavado bronquiolveolar

4. Preparación para la PCR en tiempo real

Nota: Deben usarse los tubos y las tapas correctos. (ver MATERIALES REQUERIDOS NO INCLUÍDOS)

Nota: Puntas con filtro resistente a aerosoles y guantes ajustados deben usarse cuando se preparen las muestras. Poner mucho cuidado para evitar las contaminaciones cruzadas.

Nota: Descongele los reactivos por completo en hielo.

Nota: Centrifugue los tubos de reactivos brevemente para remover las gotas del interior de las tapas.

Nota: Si usted desea utilizar el RB5 IC para supervisar el procedimiento de ácido nucleico aislada y para comprobar si es posible inhibición de la PCR, que ya han sido añadido a los ácidos nucleicos extraídos. En este caso, consulte el esquema de pipeteo A-1. O si usted desea utilizar el IC RB5 exclusivamente para el control de inhibición de la PCR, se debe añadir directamente a la maestra de PCR. En este caso, consulte el esquema de pipeteo A-2.

A. Preparación de la PCR Mastermix

A-1.

5 μL	4X RB5 TOM
5 μL	4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)
5 μL	Agua libre de RNasa
15 μL	Volumen total de PCR Mastermix

A-2.

5 μL	4X RB5 TOM
5 μL	4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)
2 μL	RB5 IC
3 μL	Agua libre de RNasa
15 μL	Volumen Total de PCR Mastermix

Nota: Calcule la cantidad necesaria de cada reactivo basándose en el número de reacciones (muestras + controles).

B. Mezcle por inversión 5 veces ó mediante agitador *vórtex* y centrífugue brevemente.

C. Coloque alícuotas de 15 μL del PCR *Mastermix* en tubos para PCR y cierre las tapas

D. Agregue 5 μL de cada muestra de ácidos nucleicos a su tubo respectivo.

15 μL	PCR Mastermix
5 μL	Muestra de ácidos nucleicos
20 μL	Volumen Total de reacción

Nota: Utilice una punta de pipeta nueva con cada muestra diferente.

Nota: Para el **Control Negativo**, utilice 5 μL de agua libre de RNasa en lugar de muestra de ácido nucleico.

Nota: Para el **Control Positivo**, utilice 5 μL RB5 PC.

Nota: Evite la contaminación cruzada del PCR Mastermix y las muestras con el Control Positivo.

Nota: En el caso del CFX-96™, no etiquete la tapa

CONFIGURACIÓN DEL EQUIPO PARA PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Sistema de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad)

1.1 Configuración del Equipo para PCR en tiempo real

Nota: la configuración del Sistema de PCR en tiempo real CFX96™ para la detección de CP, MP, LP, BP, BPP y IC puede ser dividido en los siguientes pasos: Programación del protocolo, programación de la placa y ejecución.

A. Programación del protocolo

1) En el menú principal, haga clic en Protocol para abrir la ventana de Experiment Setup.

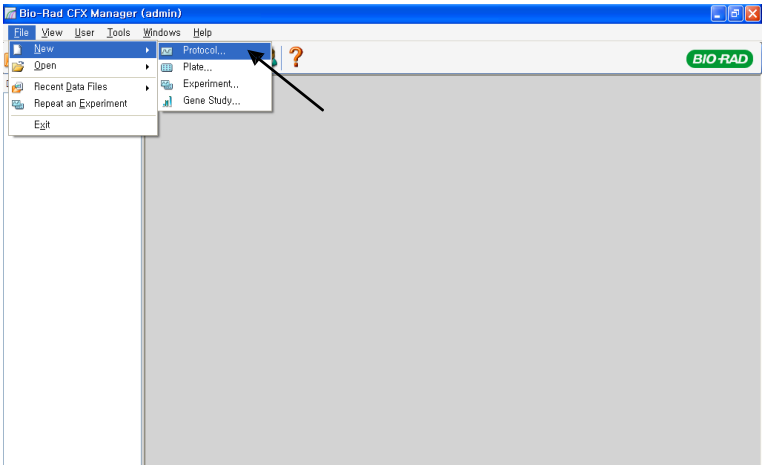


Fig. 1. Programación del protocolo. Creación de un Nuevo protocolo o cargar un protocolo existente para el experimento.

2) En Protocol Editor, defina el perfil termico como se indica a continuación:

Segmento	No. de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	50℃	4 min
2	1	95℃	15 min
3	30	95℃	30 sec
4		60℃	1 min
5		72℃	30 sec
6	1	55℃	30 sec
7	1	**Curva de fusión 55℃ ~ 85℃ (5 s / 0.5℃)**	
8	10	95℃	30 sec
9		60℃	1 min
10		72℃	30 sec
11	1	55℃	30 sec
12	1	**Curva de fusión 55℃ ~ 85℃ (5 s / 0.5℃)**	
13	10	95℃	30 sec
14		60℃	1 min
15		72℃	30 sec
16	1	55℃	30 sec
17	1	**Curva de fusión 55℃ ~ 85℃ (5 s / 0.5℃)**	

Note: Lectura de plato en el segmento 7,12 y 17. La fluorescencia es detectada en fusión.

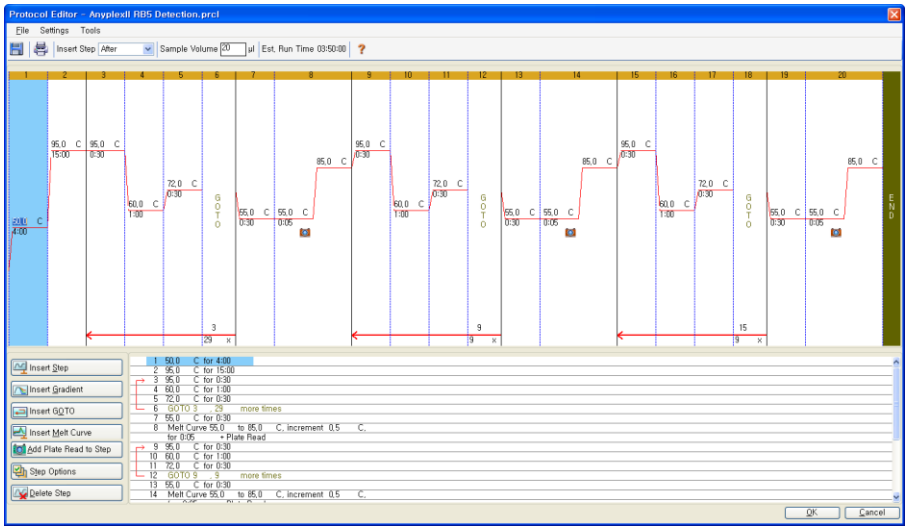


Fig. 2. **Protocol Editor.**

3) Haga clic en ***Sample Volume*** y modifique el valor a 20 μL.
4) Haga clic en ***OK***; se abrirá la ventana ***Experiment Setup***.

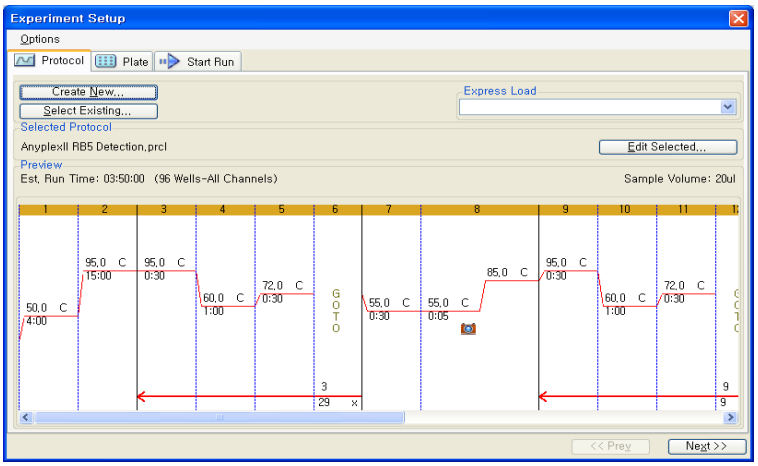


Fig. 3. **Protocolo de configuración del experimiento**

B. Programación de la placa

1) En **Experiment Setup Plate**, haga click en **Create New** para abrir el **Plate Editor** y crear una nueva placa.

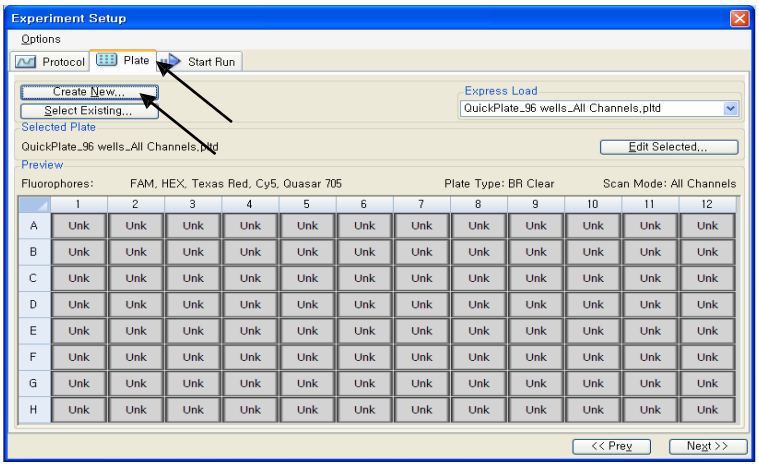


Fig. 4. **Plate Editor.** Crear una nueva placa ocargar una ya existente para el experimento.

2) Haga click en **Select Fluorophores** para indicar los fluoróforos (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** y **Quasar 670**) que serán utilizados en el experimento.

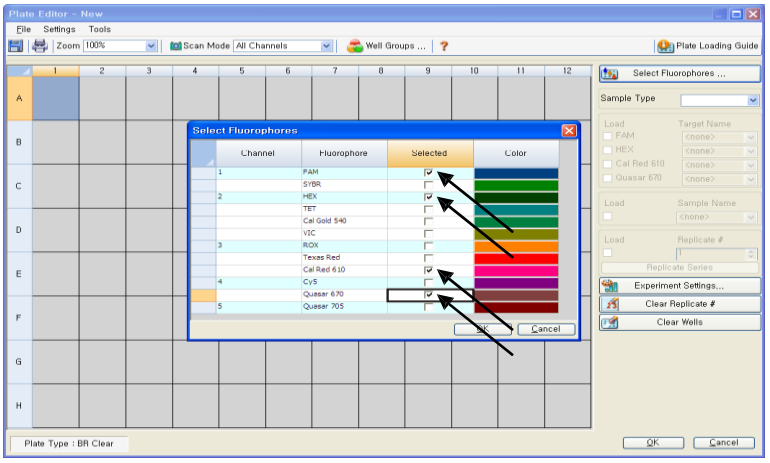


Fig. 5. **Select Fluorophores.** (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** y **Quasar 670**)

3) Seleccione los pocillos y haga clic en *Sample Type* en el menú desplegable.
- **Unknown**: Muestras clínicas
- **Negative Control**
- **Positive Control**

4) Haga clic en las casillas de verificación apropiadas (FAM, HEX, CAL Red 610 y Quasar 670) para cargar los fluoróforos en los pocillos seleccionados.

5) Escriba el nombre de la muestra en *Sample Name* y presione *Enter*.

6) En **Settings** del menu principal del **Plate Editor**, escoja el **Plate Size (tamaño de la placa)** y el **Plate Type (tipo de placa) (BR White)**.

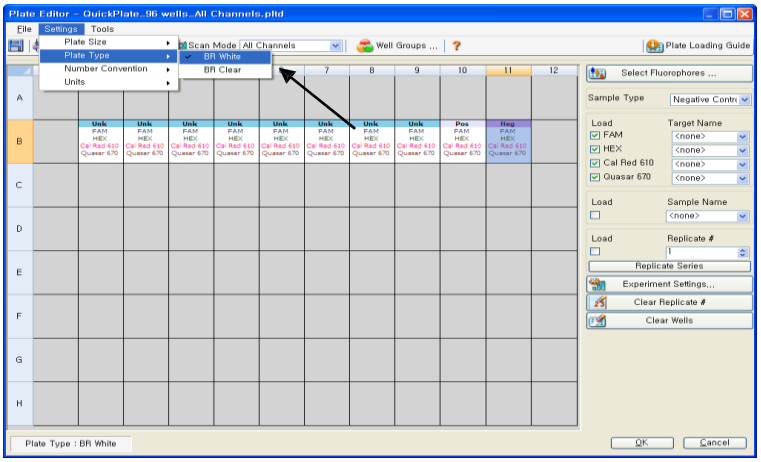


Fig. 6. **Plate Setup.**

7) Haga click en **OK** y guarde la nueva placa agregada al archivo.

8) Se abrirá entonces la ventana de **Experiment Setup.**

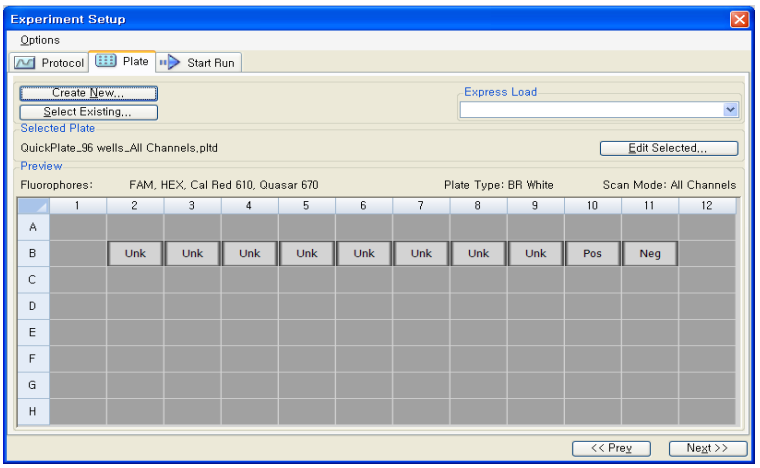


Fig. 7. **Experiment Setup Plate.**

C. Ejecución de la prueba

1) En la ventana **Experiment Setup Start Run**, Haga click en **Close Lid** para cerrar la tapa del equipo.

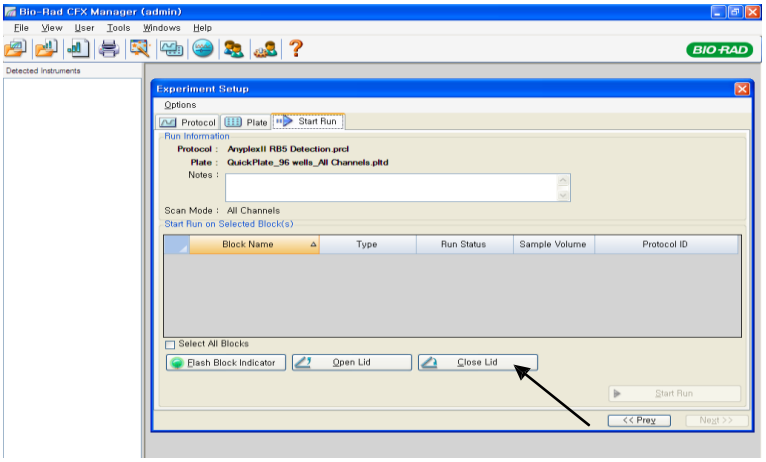


Fig. 8. **Close Lid.**

2) Haga click en **Start Run**.

3) Guarde el archivo del ensayo en la carpeta que usted designe. Llene en el archivo el nombre y de click en **SAVE**, y la máquina dará inicio.

1.2. Análisis de datos

A. Creación de la carpeta específica para guardar los datos

1) Para salvar los datos de cada punto de resultados del archivo, cree tres carpetas.
2) El nombre de la carpeta por guardar del primer punto de fusión es “1”, el nombre de la segunda carpeta es “2”, y el tercer nombre es “3”.

.

A. B. Pre-ajustes para el análisis de datos en el CFX-96

1) Después del ensayo, haga clic en la pestaña ***Melt curve*** para confirmar los resultados de los picos de las curvas.

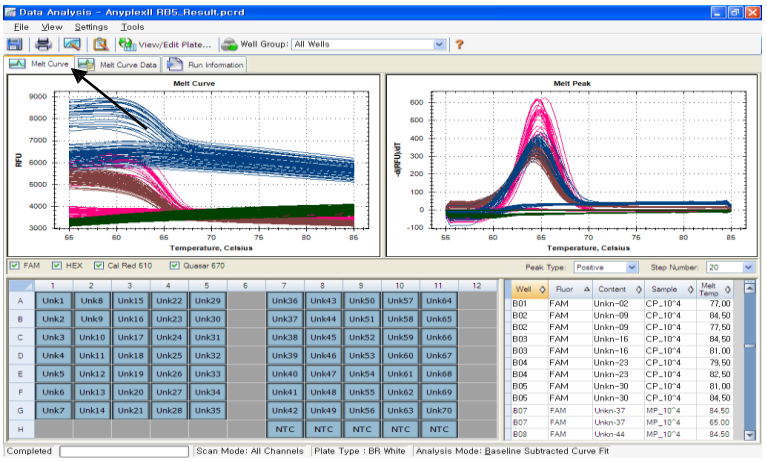


Fig. 9. **Resultado del Pico de Fusión**

2) Seleccione solo Quasar 670, el umbral de pico de fusión debe ser ajustado a cero.

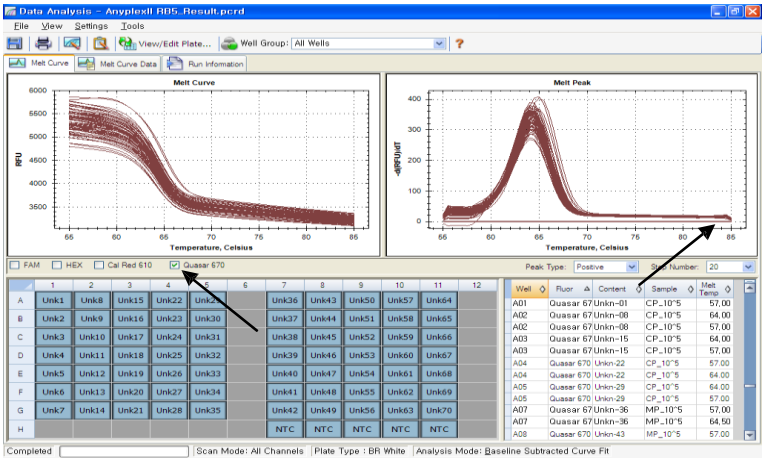
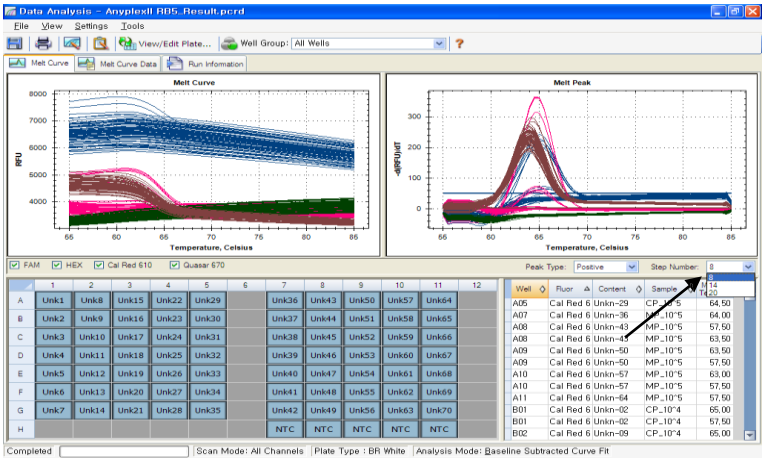


Fig. 10. **Pico de fusion de Quasar 670.**

3) Haga click en la selección del Paso número 8 (**Step number "8"**) y seleccione **Export All Data Sheets to Excel (exportar todas las hojas de datos a Excel)** desde el menú de herramientas



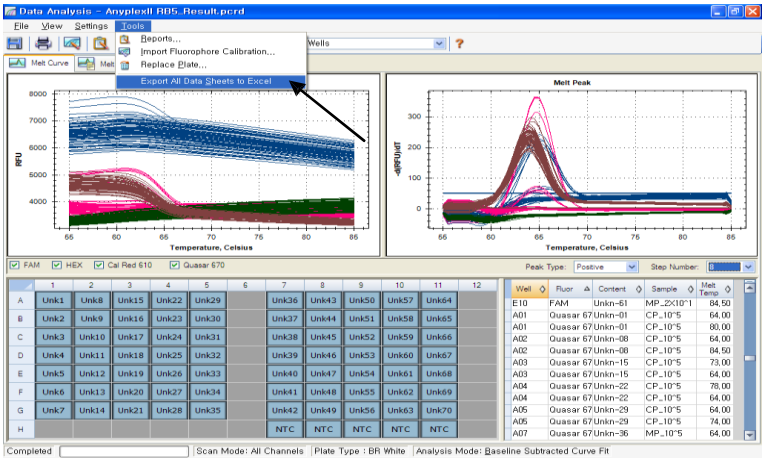


Fig. 11**. Exportar todas las hojas de datos a Excel.**

4) Guarde los resultados a la carpeta “**1**”, cuando la ventana nueva se abra.

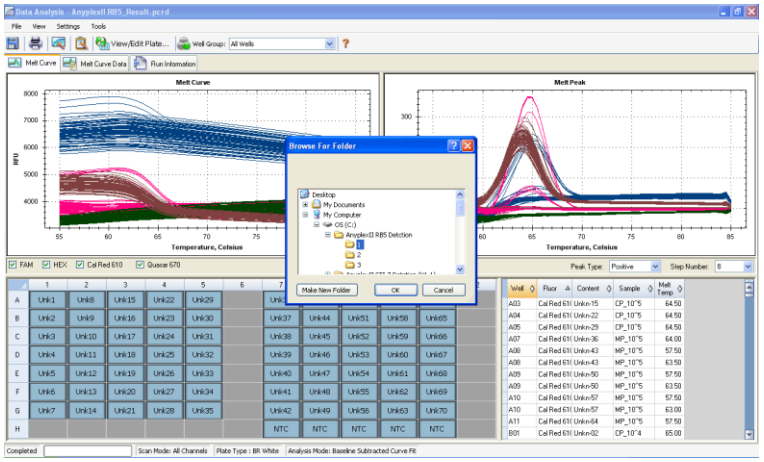


Fig. 11. **Exporte todos los datos en hojas de cálculo en el análisis de datos de la carpeta asignada.**

5) Verifique que los resultados se guardaron en la ubicación designada.

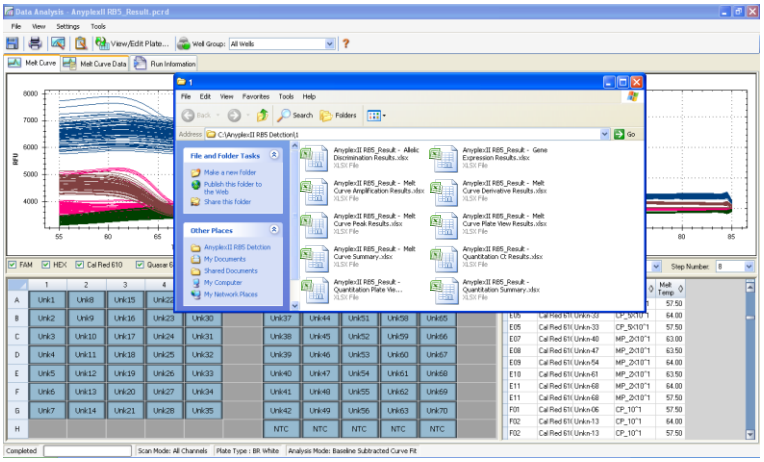


Fig. 12**. Archivos de los resultados exportados**

6) Regrese al paso 3) y seleccione el paso número “14”. Repita los pasos 4) y 5) y guarde los datos en la carpeta “2”. Luego vuela al paso 3) y seleccione el paso número “20”. Repita los pasos 4) y 5) y guarde los datos en la carpeta “3”. Los datos de cada paso es guardado como se muestra a continuación.

Numero de paso	Carpeta designada
8	1
14	2
20	3

B. Ajustes para el análisis de datos en el *Seegene Viewer*

1) Abra en pantalla el programa *Seegene Viewer*, haga clic en *Open* para encontrar los archivos guardados en la carpeta “1”.

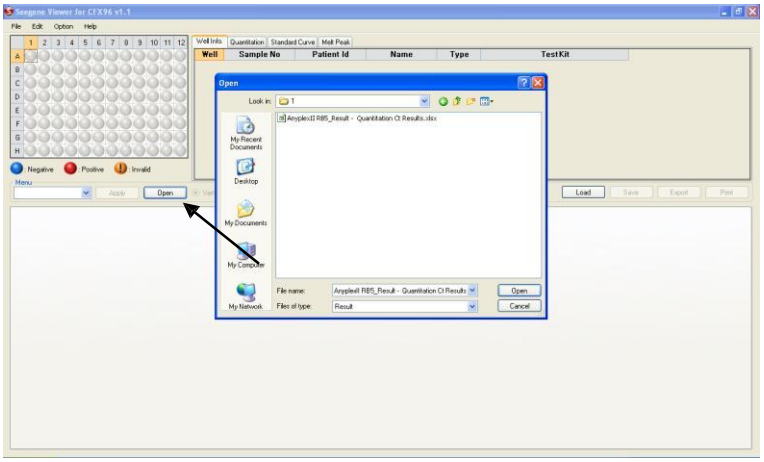


Fig. 13. **Visor Seegene.**

2) Después de abrir el archivo de resultados:

① Seleccione los pocillos de las muestras

② Haga clic en la columna Menú y seleccione la prueba realizada de las opciones de la lista

③ Haga clic en **Apply** para obtener el resultado final

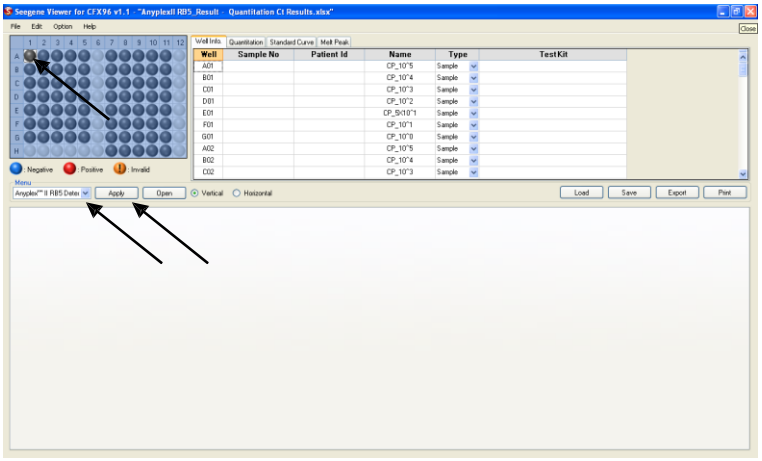


Fig. 14. **Ajustes para el análisis de datos en el Visor de Seegene**

3) Verifique el resultado en cada pozo.

Nota: Nombre el NC lleno en “ **PCRC**” y luego, haga click en **Apply** cuando el control de PCR se use por IC.

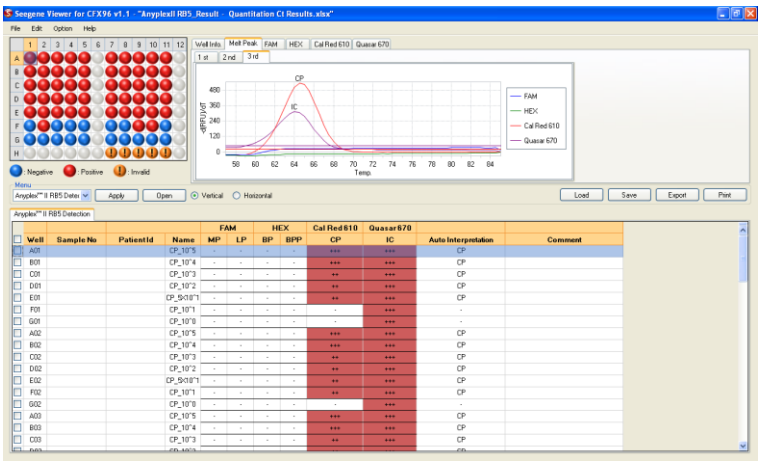
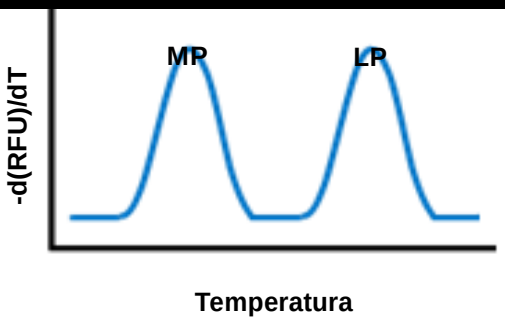
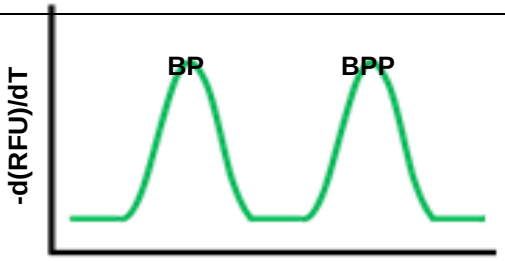
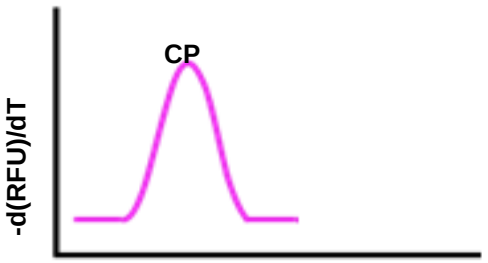
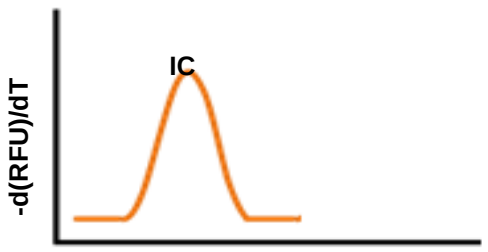


Fig. 15. **Resultados de la prueba del CFX96 en el visor de Seegene.**

RESULTADOS

1. Información del analito

Fluoróforo	Anyplex™ II RB5 Detection
FAM	
HEX	
Cal Red 610	
Quasar 670	

2. Interpretación de Resultados

Resultado*	Resultado del Control Interno*	Interpretación
+++ o ++ o +	+++ o ++	ADN de objetivo detectado
+++ o ++ o +	+ o -	ADN de objetivo detectado
-	+++ o ++	ADN de objetivo no detectado
-	+ o -	**Inválido** - Señal débil o negativa del control interno es indicativa de una toma de muestra inadecuada, o errores en el procedimiento o presencia de inhibidores. - Procese otra alícuota de la muestra original y repita la prueba.

Resultado	CMTA cíclico- (cyclic-Catcher Melting Temperature Analysis)		
	Primer punto CMTA	Segundo punto CMTA	Tercer punto CMTA
+++	+	+	+
++	-	+	+
+	-	-	+
-	-	-	-

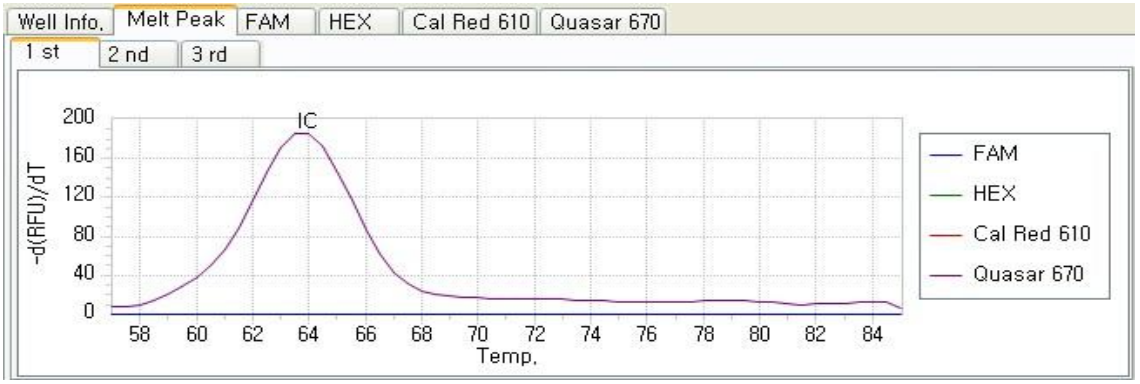
* El control Interno y otras señales no observadas: ver Solución de Problemas, *TROUBLESHOOTING*).

La detección del Control Interno (IC) en el canal de detección del Quasar 670 no es requerida para resultados positivos. Títulos elevados de otros analitos pueden conducir a una reducción o ausencia de la señal del Control Interno.

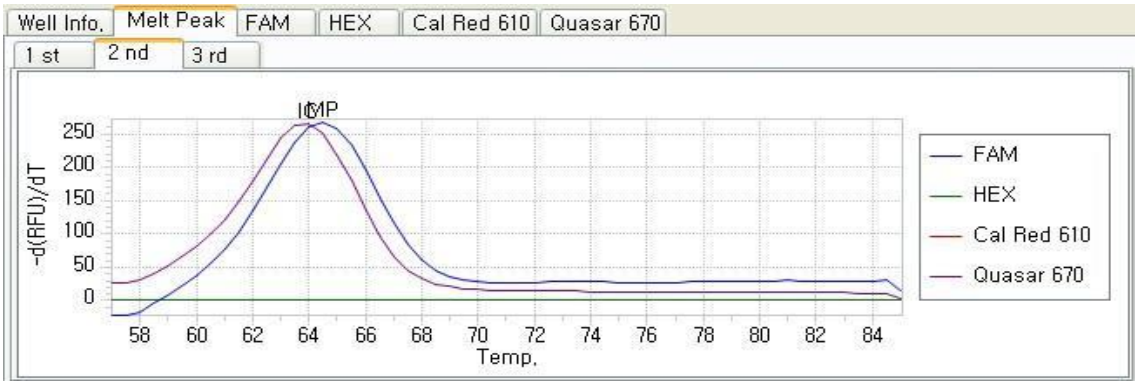
3. Aplicación a muestras clínicas

< Muestra 1 >

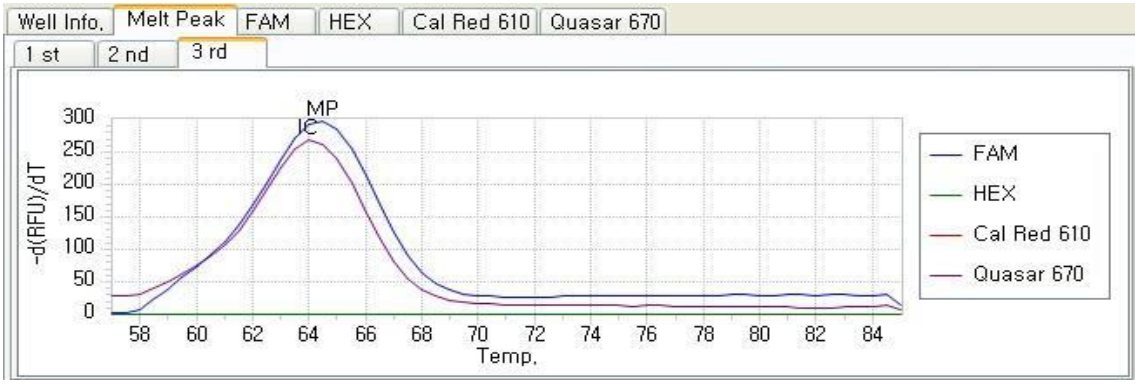
1er Pico de fusión (Primer punto CMTA)



2do Pico de Fusión (Segundo punto CMTA)



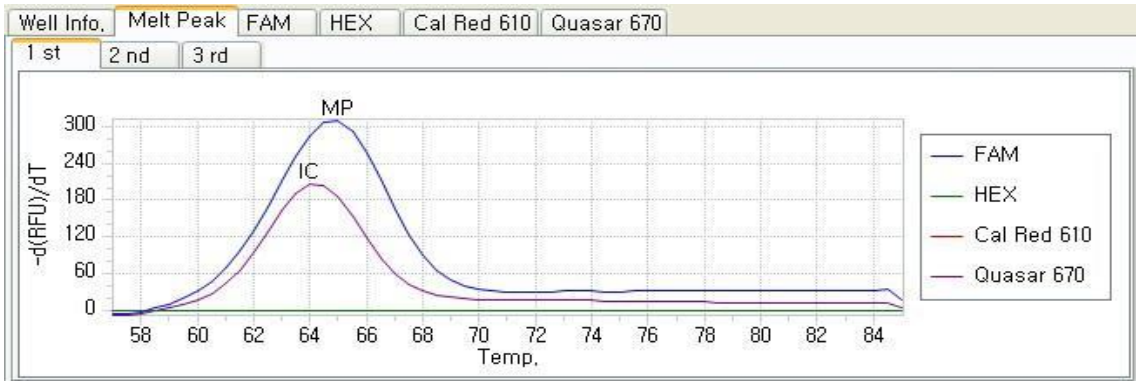
3er Pico de Fusión (Tercer punto CMTA



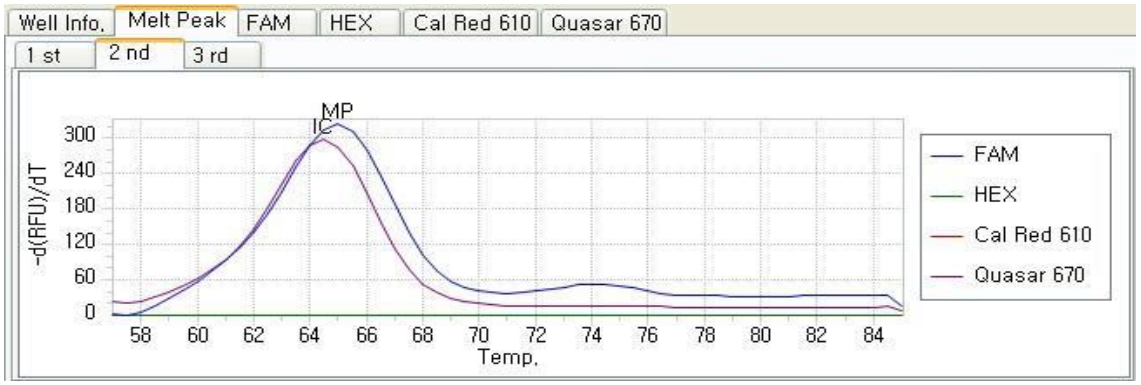
Name	FAM		HEX		Cal Red 610	Quasar 670	Auto interpretación
	MP	LP	BP	BPP	CP	IC	
1	++	-	-	-	-	+++	MP

< Muestra 2 >

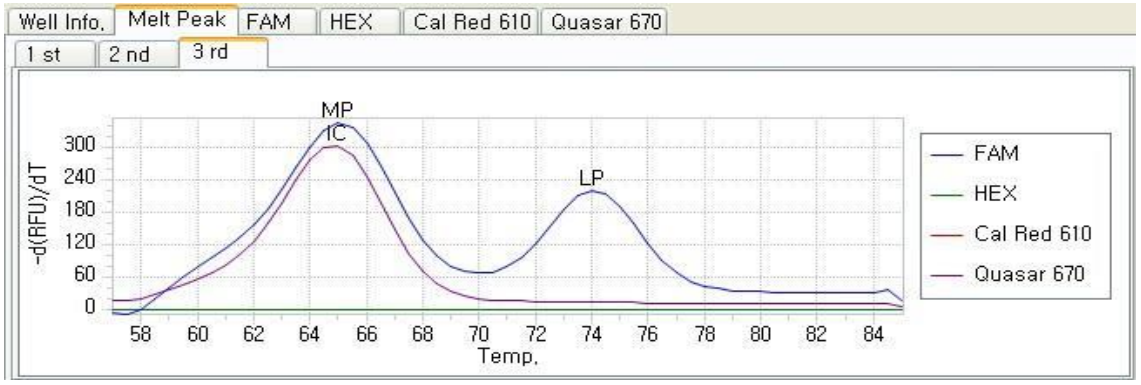
1er Pico de Fusión (Primer punto CMTA)



2do Pico de Fusión (Segundo punto CMTA)



3er Pico de Fusión (Tercer Punto CMTA)



Name	FAM		HEX		Cal Red 610	Quasar 670	Auto interpretacion
	MP	LP	BP	BPP	CP	IC	
2	+++	+	-	-	-	+++	MP, LP

SOLUCION DE PROBLEMAS

Anyplex™ II RB5 Detection		
OBSERVACION	**CAUSAS PROBABLES**	**SOLUCION**
No se observa la señal del Control Interno ni ninguna otra señal.	Los fluoróforos para el análisis de datos no cumplen con el protocolo.	Seleccione los fluoróforos correctos para el análisis de datos.
	Ciclos de PCR y/o temperaturas en el equipo	Verifique las condiciones de la PCR y repita con los ajustes adecuados de ser necesario.
	Los reactivos permanecieron a temperatura ambiente por un tiempo prolongado o se almacenaron en	Verifique las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (ver la etiqueta en el kit) de los reactivos, utilice un kit nuevo de ser necesario.
	Programación incorrecta.	Repita el procedimiento de detección con los ajustes adecuados.
	Extracción de ácido nucleico fallida	Si el Control Interno ha sido añadido a la extracción, una ausencia de la señal de CI puede indicar la pérdida del ácido nucleico durante la extracción. Asegurese de utilizar el método de aislamiento recomendado. La muestra debe ser diluida con buffer salino 1/10 y luego agregar el Control Interno RB5 IC a la muestra diluida.
La señal del control interno no es observada	Alta carga del ácido nucleico del patógeno	Si la señal del objetivo es observada, es probable que sea positiva para el patógeno, aunque la señal del control interno no se observe. Si desea verificar el control interno, diluya el ácido nucléico en D.W. esterilizada (10-100X), y repita el paso de PCR con el ácido nucleico diluido.
	Presencia de inhibidores de PCR.	Diluya el ácido nucleico aislado en D.W. estéril (10-100x), y repita la PCR con el ácido nucleico diluido. (Si la muestra está todavía presente, reinicie desde la extracción de ácido nucleico)
Falsos positivos o señal observada en el control Negativo.	Presencia de contaminación cruzada.	Descontamine todas las superficies e instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas con filtro durante el procedimiento de extracción. Cambie puntas entre tubos. Repita el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos con un nuevo set de reactivos.

Anyplex™ II RB5 Detection		
OBSERVACION	**CAUSAS PROBABLES**	**SOLUCION**
Falso negativo o no se observa señal en los controles positivos	Error en la toma de muestra.	Tome una nueva muestra.
	Almacenamiento incorrecto de la muestra.	Tome una nueva muestra y repita el procedimiento completo, Asegure que la muestra sea almacenada en las condiciones apropiadas.
	Error en la extracción de ácido nucleico.	Repita la extracción del ácido nucleico.
	Error en la adición del ácido nucleico al tubo de PCR correspondiente.	Verifique el número de muestras, asegure que se adicione el ácido nucleico al tubo de PCR correcto durante el proceso de detección.
	Presencia de inhibidores	Diluya la muestra en PBS (10-100x), y repita desde el paso de extracción con la muestra diluida.
	Los fluoroforos para el análisis de datos no cumple con el protocolo.	Seleccione el fluoróforo correcto para el análisis de datos.
	Programación incorrecta	Repita la PCR con la programación correcta
	Mezcla de PCR incorrecta	Verifique que todos los componentes se hayan adicionado o no. (Si usa un premix precompuesto, debe reducir la sensibilidad) Cada reactivo utilizado para la homogeneización y gire hacia abajo el tubo de reactivo antes de poner la PCR en tiempo real.
	Se dejaron los reactivos por largo tiempo a temperatura ambiente o se almacenaron en condiciones no apropiadas.	Verifique la fecha de vencimiento de los reactivos, y use uno nuevo si es necesario.

DESEMPEÑO

1. Especificidad

La alta especificidad del kit Anyplex II RB5 está garantizada por los cebadores específicamente diseñados para los objetivos de interés y las condiciones de reacción. Anyplex II RB5 ha sido probado para reactividad cruzada en 69 diferentes patógenos.

Organismo	Cadena No.	Resultado
Bordetella parapertussis	ATCC 15311	BPP Detectado
Bordetella pertussis	ATCC 9797	BP Detectado
Chlamydiaceae pneumoniae AR-39	ATCC 53592	CP Detectado
Chlamydiaceae pneumoniae CM-1	ATCC VR-1360	CP Detectado
Legionella pneumophila Serotype1	ATCC 33152	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype2	KCCM 41778	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype3	ATCC 33155	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype4	ATCC 33156	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype5	KCCM 41782	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype6	KCCM 41781	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype7	KCCM 41783	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype8	KCCM 41784	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype9	ATCC 35289	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype10	ATCC 43283	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype11	ATCC 43130	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype12	ATCC 43290	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype13	ATCC 43736	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype14	ATCC 43703	LP Detectado
Legionella pneumophila Serotype15	ATCC 35251	LP Detectado
Mycoplasma pneumoniae M129-B7	ATCC 29342	MP Detectado
Mycoplasma pneumoniae FH strain	ATCC 15531	MP Detectado
Acinetobacter baumannii	ATCC 15308	No detectado
Acinetobacter schindleri	KCTC 12409	No detectado
Aeromonas hydophila	KCTC 2358	No detectado
Bacteroides fragilis	ATCC 25285	No detectado
Bordetella avium	ATCC 35086	No detectado
Bordetella bronchiseptica	ATCC BAA-588D	No detectado
Bordetella hinzii	ATCC 51783	No detectado
Bordetella holmesii	ATCC 51541	No detectado
Candida albicans	ATCC 10231D-5	No detectado
Candida glabrata	ATCC 2001	No detectado
Candida tropicalis	ATCC 750	No detectado
Chlamydia trachomatis	ATCC 66029D	No detectado

Organismo	Cadena No.	Resultado
Chlamydophila psittaci	ATCC VR-125	No detectado
Clostridium perfringens	ATCC 13124	No detectado
Corynebacterium diphtheriae	ATCC 11913	No detectado
Enterobacter aerogenes	ATCC 13048	No detectado
Enterobacter cloacae	ATCC 13047	No detectado
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	No detectado
Escherichia coli	ATCC 15489	No detectado
Gardnerella vaginalis	ATCC 14019	No detectado
Haemophilus influenzae	ATCC 33533	No detectado
Herpes Simplex Virus, type I	ABi 68-097	No detectado
Herpes Simplex Virus, type II	ATCC VR-734	No detectado
HPV type 16	ATCC 45113D	No detectado
HPV type 18	ATCC 45152D	No detectado
Human Adenovirus type1 (type C)	ATCC VR-1	No detectado
Human Bocavirus	Clinical isolate	No detectado
Human Coronavirus 229E	ATCC VR-740	No detectado
Human Coronavirus NL63	Clinical isolate	No detectado
Human Coronavirus OC43	ATCC VR-1558	No detectado
Human Enterovirus type 71(A)	ATCC VR-784	No detectado
Human Metapneumovirus	Clinical isolate	No detectado
Human Parainfluenza 1	ATCC VR-1380	No detectado
Human Parainfluenza 2	ATCC VR-92	No detectado
Human Parainfluenza 3	ATCC VR-93	No detectado
Human Parainfluenza 4a	ATCC VR-1378	No detectado
Human Parainfluenza 4b	ATCC VR-1377	No detectado
Human Respiratory syncytial virus A	ATCC VR-26	No detectado
Human Respiratory syncytial virus B	ATCC VR-955	No detectado
Human Rhinovirus 14	ATCC VR-284	No detectado
Influenza A virus (H1N1)	ATCC VR-546	No detectado
Influenza A virus (H3N2)	ATCC VR-544	No detectado
Influenza B virus	ATCC VR-101	No detectado
Klebsiella pneumoniae ssp. Pneumoniae	ATCC 13883	No detectado
Legionella anisa	ATCC 35292	No detectado
Legionella bozemanii	ATCC 33217	No detectado
Legionella cincinnatiensis	ATCC 43753	No detectado
Legionella fairfieldensis	ATCC 49588	No detectado
Legionella gormanii	ATCC 33218	No detectado
Legionella jordanis	ATCC 33623	No detectado
Legionella longbeachae	ATCC 33462	No detectado

Organismo	Cadena No.	Resultado
Legionella oakridgensis	ATCC 33761	No detectado
Legionella worsleiensis	ATCC 49508	No detectado
Listeria monocytogenes	ATCC 19111	No detectado
Mycobacterium smegmatis	ATCC 19420	No detectado
Mycobacterium tuberculosis	Clinical isolate	No detectado
Mycoplasma buccale	ATCC 23636	No detectado
Mycoplasma fermentans	ATCC 19989	No detectado
Mycoplasma genitalium	ATCC 33530	No detectado
Mycoplasma hominis	ATCC 23114	No detectado
Mycoplasma orale	ATCC 23714	No detectado
Mycoplasma salivarium	ATCC 23064	No detectado
Neisseria gonorrhoeae	ATCC 700825	No detectado
Neisseria meningitidis	ATCC 700532D	No detectado
Neisseria mucosa	ATCC 19696	No detectado
Neisseria perflava	ATCC 14799D-5	No detectado
Neisseria sicca	ATCC 5415	No detectado
Propionibacterium acnes	ATCC 6919	No detectado
Proteus mirabilis	ATCC 12453	No detectado
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15522	No detectado
Rhinovirus B(HRV)	ATCC VR-284	No detectado
Salmonella typhimurium	KCCM 40253	No detectado
Staphylococcus epidermidis	ATCC 35984D-5	No detectado
Stenotrophomonas maltophilia	ATCC 13637	No detectado
Streptococcus agalactiae	ATCC 14364	No detectado
Streptococcus mitis	ATCC 6249	No detectado
Streptococcus mutans	ATCC 25175	No detectado
Streptococcus pneumoniae	ATCC BAA-255	No detectado
Streptococcus pyogenes	ATCC 19615	No detectado
Trichomonas vaginalis	ATCC 30001	No detectado
Ureaplasma urealyticum	ATCC 27618	No detectado
Vibrio parahaemolyticus	ATCC 27969	No detectado
Yersinia enterocolitica	ATCC 23715	No detectado

Para verificar la veracidad de los resultados, las pruebas se realizaron por triplicado.

2. Sensibilidad

Para determinar la sensibilidad de la prueba Anyplex II RB5, se hicieron diluciones seriadas estándar de 10^5 a 10^{-1} copias de ADN objetivo clonado por reacción, y fue analizado con el Anyplex™ II RB5 Detection. La detección límite para la sensibilidad es de 50 copias/reacción.

3. Reproducibilidad

La reproducibilidad se llevó a cabo en 3 puntos diferentes de tiempo en el curso de 10 días por 3 personas diferentes. Los mismos resultados se obtuvieron en todas las pruebas, confirmando la reproducibilidad del producto.

REFERENCIAS

1 Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Research. (2007). 35(6): e40

2 Cho MC, Kim H, An D, Lee M, Noh SA, Kim MN, Chong YP, Woo JH. [Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, and Legionella pneumophila] Ann Lab Med. (2012) 32(2): 133-138

3 Deborah A. Wilson, Belinda Yen-Lieberman, Udo Reischl, Steve M. Gordon, and Gary W. Procop. [Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the mip gene.] Journal of Clinical Microbiology. (2003) 41: 3327-3330

4 Erin A. McDonough, Christopher P. Barrozo, Kevin L. Russell, and David Metzgar. [Multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens] Molecular and Cellular Probes. (2005) 19: 314-322

5 Mustapha M. Samrakandi, Suat L. G. Cirillo, Dennis A. Ridenour, Luiz E. Bermudez, and Jeffrey D. Cirillo. [Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains.] Journal of Clinical Microbiology. (2002) 40: 1352-1362

6 M. Khanna, J. Fan, K. Pehler-Harrington, C. Waters, P. Douglass, J. Stallock, S. Kehl, and K. J. Henrickson. [The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that simultaneous detection of five organisms, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, and *Bordetella pertussis*, and its real-time counterpart.] Journal of Clinical Microbiology. (2005) 43: 565-571

7 Park J, Kim JK, Rheem I, Kim J. [Evaluation of Seeplex Pneumobacter multiplex PCR kit for the detection of respiratory bacterial pathogens in pediatric patients] Korean J Lab Med. (2009) 29(4): 307-313

8 Templeton KE, Scheltinga SA, van der Zee A, Diederen BM, van Kruijssen AM, Goossens H, Kuijper E, Claas EC. [Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, and Bordetella holmesii for clinical diagnosis.] J Clin Microbiol. (2003) **41**(9): 4121-4126

9 Winchell JM, Thurman KA, Mitchell SL, Thacker WL, Fields BS. [Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation] J Clin Microbiol. (2008) 46(9): 3116-3118

10 Yvonne Kuoppa, Jens Bomman, Lena Scott, Urban Kumlin, Irene Eriksson, and Annika Allard. [Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR.] Journal of Clinical Microbiology. (2002) 40: 2273-2274

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Explicación de los simbolos usados en las etiquetas y manual.

Símbolo	Explicación
IVD	Para Diagnóstico in vitro
LOT	Número de Lote
REF	Número de catálogo
	Fecha de vencimiento
	Temperatura de Almacenamiento
	Precaución
PRIMER	Mezcla de oligonucleotidos para amplificación y detección
WATER	Agua libre de Rnasas
CONTROL +	Control Positivo
CONTROL IC	Control Interno
PREMIX	Mezcla Maestra para PCR Anyplex
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Consulte instrucciones de uso

Seegene
Anyplex™ II RB5 Detection

ORDERING INFORMATION

Anyplex™ II series		
RB7500Y	**Anyplex™ II RB5 Detection**	**50 rxns**
RV7G01Y	Anyplex™ II RV16 Detection	50 rxns
Seeplex® RV series		
RV3210	Seeplex® RV7 Detection	50 rxns
RV6C00Y	Seeplex® RV12 ACE Detection	50 rxns
RV6F00Y	Seeplex® RV15 ACE Detection	50 rxns
Accessory product		
SG1701	Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	50 preps
SGRT801	cDNA Synthesis Premix	96 rxns
Automated purification system		
SPN1200	SEEPREP12™	EA
SPN1004	SEEPREP12™ Viral NA Kit	96 preps
SPN1101	SEEPREP12™ Tip Set	96 tips
65415-02	MICROLAB Nimbus IVD	EA
173000-075	MICROLAB STARlet	EA
744800.4	STARMag 96 Virus	384T / 1box